Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. E. Letterer

Zyto- und histoenzymatische Untersuchungen am Aszitestumor der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
REINHARD NORTHE
aus Halle/Saale

7123

1962

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. E. Letterer

Zyto- und histoenzymatische Untersuchungen am Aszitestumor der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
REINHARD NORTHE
aus Halle/Saale

1962

Dekan:	Professor Dr. Emil Tonutti
1. Berichterstatter:	Dozent Dr. Wolfgang Gössner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. Erich Letterer

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 1

Versuchsanordnung 3

I. Zell- und Gewebematerial 3
II. Fixierung 3
III. Färbungen 4
IV. Histochemische Reaktionen 4
V. Enzymhistochemische Reaktionen 4

Befunde am Tumoraszites 5

I. Zytologie 5
II. Zytochemie 7
1. Reaktion auf DNS und Färbungen auf RNS 7
2. Färbung mit Sudanschwarz 7
3. PAS-Reaktion 8
III. Enzymzytochemie 8
1. Unspezifische Esterase 8
2. Alkalische Phosphatase 9
3. Saure Phosphatase 9
4. Adenosintriphosphatase und 5-Nukleotidase 10
5. DPN-H-Diaphorase 11
6. Lactatdehydrogenase 11
7. Succinodehydrogenase 12
8. Zytochromoxydase 12

Befunde an soliden Tumoren 13

I. Histologie 13
II. Enzymhistochemie 13
1. Unspezifische Esterase 13
2. Saure Phosphatase 14
3. Adenosintriphosphatase 14
4. Alkalische Phosphatase 14
5. 5-Nukleotidase 14
6. DPN-H-Diaphorase und Succinodehydrogenase 15

Besprechung der Ergebnisse 16

Zusammenfassung 23

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0062

EINLEITUNG

Seit der Erzeugung des EHRLICHSCHEN Aszitestumors an der Maus durch LOEWENTHAL und JAHN (1) wurden an diesem und an anderen inzwischen gezüchteten Tumoraszitesvarianten umfangreiche und vielfältige Untersuchungen angestellt.

Diese beschäftigen sich einerseits mit der Zytologie der Tumorzellen, wobei licht-, phasenkontrast-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Verfahren zur Anwendung gelangten (2-28). Andererseits dienen sie der Erforschung der Virulenz und der Stoffwechsel-leistungen und -besonderheiten dieser Krebszellen, sowie der Bestandteile in der Aszitesflüssigkeit. Dabei stehen für uns vornehmlich Enzymbefunde im Vordergrund (29-44). Ergebnisse dieser Art wurden vorwiegend mit biochemischen Methoden erarbeitet, während Befunde zytochemischer und enzymzytochemischer Natur nur vereinzelt und teilweise älteren Datums vorliegen.

So stellte SEEGER (20) an den Aszitestumorzellen zahlreiche Reaktionen auf Fette, Kohlenhydrate, Stearine, Eiweissstoffe, Follikelhormon, Vitamine, Oxydasen, Peroxydasen und Zytochromoxydase an. DOMAGK (7) diskutiert über Be-

1 Loewenthal u. Jahn 1932
2 Adams u. Prince 1957
3 Bayreuther 1952
4 Braun 1958
5 Danneel u. Güttes 1952
6 Dittmar u. Maas 1944
7 Domagk 1956
8 Homann 1952, 1954
9 Huth 1952, 1953
10 Jakob 1942
11 Kieser 1957
12 Klug 1961
13 Kühne 1958
14 Landschütz u. Kausche 1951
15 Levan u. Hauschka 1953
16 Löblich u. Landschütz 1960
17 Niklowitz 1958
18 Schairer 1943, 1955
19 Schümmelfeder u. Wessel 1956
20 Seeger 1937, 1938, 1939 b, 1940 a, b, c, d
21 Seeger u. Schacht 1958
22 Selby 1953
23 Selby et al. 1956
24 Weissmann u. Gilgen 1956
25 Werth 1958
26 Wessel u. Bernhard 1957
27 Wolff 1959
28 Yasuzumi u. Sugihara 1958
29 Ács et al. 1954
30 Chance et al. 1952
31 Hawtrey u. Silk 1960
32 Hinsberg et al. 1954
33 Höller u. Leonhartsberger 1954
34 Lindberg et al. 1953
35 Malmgren et al. 1955
36 Mc Kee et al. 1953
37 Nirenberg 1958
38 Patterson u. Podber 1956
39 Schmidt et al. 1955
40 Schümmelfeder et al. 1954
41 Talalay et al. 1951
42 Warburg u. Hiepler 1952
43 Warburg et al. 1954
44 Williams-Ashman 1953

funde von Phosphatasen, Dehydrogenasen und anderen Enzymen in gleichen Zellen. In den letzten Jahren häufen sich die Berichte über Nachweise von Zytochromoxydase und Dehydrogenasen (1-8). Nach Beginn unserer Untersuchungen erscheinen Ergebnisse über β-Glucuronidase, Esterase, saure und alkalische Phosphatase und PAS- und Sudan-reaktion in Aszitesкarzinomzellen (6, 8). LANDSCHÜTZ (9) weist als erster zytochemisch Adenosintriphosphatase (ATP-ase) in ihnen nach.

Zytochemische Enzymuntersuchungen ergänzen die biochemischen, da sie einen Einblick in den Enzymgehalt hinsichtlich Aktivität und Lokalisation einer jeden Zelle gestatten. Dagegen können Ergebnisse mit biochemischen Methoden stets nur summarische und Durchschnittswerte vermitteln (10). In den letzten Jahren wurden die enzymhistochemischen Methoden erweitert und verbessert: Azofarbstoffmethode (11), Modifikation der Schwermetallreaktionen auf Adenosintriphosphatase und 5-Nukleotidase von GOMORI durch WACHSTEIN und MEISEL (12), Indigoverfahren zum Esterase-Nachweis (13, 14), Anwendung neuer Tetrazoliumsalze durch FARBER et al. (15), (Tetrazolblau, Tetrazolpurpur), NACHLAS et al. (Nitro BT) und durch PEARSE (MTT) (11). Unsicherheiten und Fehlerquellen werden mit diesen neuen Methoden weitgehend verringert, und eine subtilere Lokalisation der Enzyme wird ermöglicht.

Mit diesen uns jetzt zur Verfügung stehenden enzymzytochemischen Methoden wurden Tumorasziteszellen bisher nur vereinzelt und in anderen Zusammenhängen (6, 8, 16), aber noch nicht systematisch untersucht. Unseren Untersuchungen, über die in dieser Arbeit berichtet werden soll, lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

1.) Welche Enzyme sind mit modernen histoenzymatischen Methoden in diesem Transplantationstumor nachweisbar ? Dabei führten wir folgende Enzymreaktionen durch: unspezifische Esterase, alkalische und saure Phosphatase, Adenosintriphosphatase (ATP-ase), 5-Nukleotidase, Lactatdehydrogenase (LDH), Succinodehydrogenase, DPN-H-Diaphorase und Zytochromoxydase.
2.) Welche Aussagen sind über die Lokalisation dieser Enzyme möglich ?
3.) Bestehen Unterschiede in der Enzym-ausstattung und -aktivität in den Ge-

---

1 Hölscher 1950
2 Schmitz 1950
3 Danneel u. Güttes 1952
4 Hirono 1957
5 Kieser 1957
6 Lindner u. v. Schweinitz 1958
7 Seeger u. Schacht 1959
8 Fishman et al. 1961
9 Landschütz 1950
10 Gössner 1958 a, b
11 Pearse 1959
12 Wachstein u. Meisel 1957
13 Holt u. Withers 1952, 1953
14 Barnett u. Seligman 1951
15 Farber et al. 1956
16 Gusek u. Lindner 1959

schwulstzellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ? Vergleichend untersuchten wir Tumorasziteszellen und solid wachsende Zellen aus Absiedlungsmetastasen in den Bauchorganen und intramuskulären Implantaten.

Zusätzlich wurden die Aszitestumorzellen auf ihr zytochemisches Verhalten gegenüber der Feulgen- und der Perjodsäure-Schiff- (PAS)-Reaktion und gegenüber Färbungen mit Methylgrün-Pyronin, Gallozyanin und Sudanschwarz geprüft.

VERSUCHSANORDNUNG

I. Zell- und Gewebematerial:

Verwandt wurde ein Aszitestumor der weissen Maus [1]. Die Übertragung geschah durch regelmässiges Überimpfen im Abstand von einer Woche von 0,5 ccm unbehandelter, frischer, tumorzellhaltiger Aszitesflüssigkeit in die Bauchhöhle weiblicher und männlicher Mäuse eines eigenen Inzuchtstammes. In der Empfänglichkeit und im Angehen des Tumors verhalten sich beide Geschlechter grundsätzlich gleich. Acht bis zehn Tage nach dem Überimpfen wurden die Tiere dekapitiert, der Tumoraszites abpunktiert und wie ein Blutausstrich auf Objektträger dünn ausgestrichen. Gleichzeitig wurden Schnittpräparate von soliden Tumormassen aus der Bauchhöhle dieser Mäuse angefertigt.

Die intramuskulären Implantate wurden gewonnen, indem weiblichen Mäusen am Oberschenkel unbehandelte, frische Tumorzellen zusammen mit der Aszitesflüssigkeit in einer Menge von 0,05 bis 0,1 ccm intramuskulär injiziert wurden. An der Injektionsstelle entwickelte sich bei allen Tieren nach wenigen Tagen ein ansehnlicher Tumor, der täglich grösser wurde und sich in seinen Grössenverhältnissen entsprechend der eingespritzten Menge unterschied. Nach elf Tagen töteten wir die Mäuse. Die Blastome, die inzwischen bis zu Pflaumenkerngrösse gewachsen waren, wurden mit der umgebenden Muskulatur herauspräpariert und als Schnittpräparate weiter behandelt.

II. Fixierung:

Im Hinblick auf die enzymzytochemischen Reaktionen wurden zahlreiche Vorversuche zur optimalen Fixierung an den Ausstrichpräparaten der Aszitestumorzel-

---

[1] Den Aszitestumor stellte uns Herr Dr. Landschütz, damals Max-Planck-Institut für Virusforschung-Tübingen, dankenswerterweise zur Verfügung.

len angestellt. Eine Fixation der Zellen ist für ihre Strukturerhaltung anzustreben, da luftgetrocknete Präparate eine deutliche Zerstörung vieler Zellstrukturen, besonders in den grossen Zellen zeigten. Mit dem von KAPLOW (1) angegebenen Gemisch [1] erhielten wir keine befriedigenden Resultate. Fixierung der noch frischen Zellen für 5 bis 10 Minuten durch Formalindampf in der feuchten Kammer gab nach unserer Erfahrung stets die besten und zuverlässigsten Enzymbilder: GÖSSNER (2).

Die Schnittpräparate der solid wachsenden Tumoren wurden teils nach Fixierung in Formol-Kalzium (nach BAKER) [2] auf dem Gefriermikrotom, teils unfixiert im Kryostaten hergestellt.

III. Färbungen:

Für zytologische Untersuchungen wurden die Aszitestumorzellen mit Hämatoxylin-Eosin, Giemsa- und May-Grünwald-Lösungen, (letztere auch modifiziert nach KARP (3)), gefärbt, während wir uns bei den Schnittpräparaten auf Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin beschränkten.

IV. Histochemische Reaktionen:

Zytochemische Untersuchungen wurden an den Aszitestumorzellen auf Desoxyribonukleinsäuren (DNS) mit der Feulgen-Reaktion angestellt, auf Ribonukleinsäuren (RNS) durch Färbungen mit Methylgrün-Pyronin; (Simultanfärbung nach ROULET und HUTH (4)) und mit Gallozyanin: (ROMEIS-ROULET), auf Lipide durch Färbung mit Sudanschwarz und auf Kohlenhydrate durch Reaktion mit Perjodsäure-Schiff'schem Reagenz (PAS). Bei den Schnittpräparaten bedienten wir uns lediglich der Feulgen-Reaktion zur Kerndarstellung.

V. Enzymhistochemische Reaktionen:

Die angewandten enzymhistochemischen Methoden sind in folgender Tabelle (Tabelle 1) zusammengestellt. Die Methoden wurden nach den Angaben von PEARSE (5) und GÖSSNER (2) (Azofarbstoffmethode) durchgeführt.

Zuletzt wurden die Präparate in Karion-Gelatine eingedeckt.

---

1 Kaplow 1955
2 Gössner 1958 a
3 Karp 1932
4 Huth 1953
5 Pearse 1959

[1] Ausstriche 2 Stunden lang lufttrocknen, anschliessend bei 0° C für 30 sek. in ein Gemisch aus 90%-gem Methanol und 10%-gem Formalin, (9 Teile Methanol und 1 Teil Formalin).

[2] 16 Stunden bei 4° C

Tabelle 1

Zusammenstellung der enzymhistochemischen Methoden.

Enzym	Methode	Substrat	Diazoniumsalz Tetrazoliumsalz	ph	Inkubiert	Temperatur
Esterase	Indigo	Bromindoxylazetat	-----	7,7	45´- 13 Std.	20° C
	Azofarbstoff	α -Naphtylazetat	Echtblausalz BB konz.	8,3	20´- 50´	20° C
	Azofarbstoff	Naphthol-As-D-Azetat	Echtblausalz BB konz.	6,8	45´- 12 Std.	20° C
Alkalische Phosphatase	Azofarbstoff	α -Naphthylphosphat	Variaminblausalz B konz.	9,2	30´- 60´	20° C
	Azofarbstoff	α -Naphthylphosphat	Echtrotsalz BB konz.	9,2	45´	20° C
	Azofarbstoff	Naphthol-As-D-phosphat	Echtblausalz BB konz.	8,3	60´-120´	20° C
	Ca-Co GOMORI	Na-Glycerophosphat	-----	9,2	30´- 60´	37° C
Saure Phosphatase	Azofarbstoff	α -Naphthylphosphat	Echtgranatsalz GBC	6,5	45´-120´	20° C
	Azofarbstoff	Naphthol-As-D-phosphat	Echtblausalz BB konz.	5,2	90´-120´	20° C
	Pb-Phosph. GOMORI	Na-Glycerophosphat	-----	5,0	30´-180´	37° C
ATP-ase	Pb-Phosph. WACHSTEIN u. MEISEL	ATP	-----	7,2	15´- 16 Std.	37° C
5-Nukleotidase	Pb-Phosph. WACHSTEIN u. MEISEL	AMP	-----	7,2	15´- 16 Std.	37° C
DPN-H-Diaphorase	FARBER et al.	DPN-H	Tetrazolpurpur	8,2 7,4	4 - 24 Std.	22° C
	NACHLAS et al.	DPN-H	Nitro BT	7,4	25´- 90´	22° C u. 37° C
	PEARSE	DPN-H	MTT	7,2	20´- 60´	22° C
Lactat-dehydrogenase (LDH)	FARBER	Na-1-Lactat	Tetrazolpurpur	7,4	21 Std.	22° C
	FARBER et al.	Na-1-Lactat	Tetrazolpurpur u. Methylenblau	7,4	7 Std.	22° C
	FARBER et al.	Na-1-Lactat	Tetrazolblau u. Methylenblau	7,4	21 Std.	22° C
	FARBER	Na-1-Lactat	Tetrazolblau	7,4	21 Std.	22° C
	NACHLAS	Na-1-Lactat	Nitro BT	7,4	60´	22° C
Succino-dehydrogenase	PEARSE	Na-Succinat	MTT	7,0	60´	22° C
	NACHLAS	Na-Succinat	Nitro BT	7,6	45´-120´	22° C u. 37° C
	WATTENBERG	Na-Succinat	Nitro BT u. Menadion	7,6	45´-120´	22° C u. 37° C
Zytochrom-oxydase	BURSTONE	Zytochrom C (endogen)	Oxynaphthosäure Variaminblau-RT-Base	7,4	60´	22° C

BEFUNDE AM TUMORASZITES

(Ausstrichpräparate)

I. Zytologie:

Das Aszitеskarzinom zeigt im Ausstrichpräparat polymorph geformte runde bis elliptische Tumorzellen. In ihrer Grösse ergeben sich fliessende Übergänge zwischen kleinen, mittleren und extrem grossen Zellformen. Bei letzteren handelt es sich häufig um mehrkernige Riesenzellen. Eine Sonderform bilden verschieden grosse Siegelringzellen, die sich in nicht allzu grosser Häufigkeit in jedem Ausstrich finden lassen. Mittelgrosse Zellen beherrschen regelmässig das Gesichtsfeld.

Die Mehrzahl der oval- oder nierenförmigen Kerne ist exzentrisch in den Zellen gelagert. Mehrkernigkeit ist häufig und unabhängig von der Zellgrösse. Ebenso unabhängig davon ist die Kerngrösse, die verschiedene Ausmasse annimmt, eine gewisse Regelklasse aber zulässt. Diploide, tetraploide und dazwischen liegende Chromosomensätze wurden von BAYREUTHER (1), LEVAN und HAUSCHKA (2), SCHAIRER (3), SCHÜMMELFEDER und WESSEL (4) und KÜHNE (5) gezählt, deren einzelne prozentuale Anteile wohl aber abhängig vom jeweiligen Tumorstamm sind. Die Kern-Plasma-Relation ist wie bei allen schnell wachsenden Tumoren und Zellen zugunsten eines grossen Kernes verschoben.

Frische, ungefärbte Tumorzellen fallen durch den Besitz heller oder dunkler, (je nach mit dem Mikroskop getroffener Schicht), Granula auf: kleine, runde Gebilde mit einem vom sonst annähernd homogenen Plasma verschiedenen Brechungsindex, die SEEGER (6) als hell-lichtbrechende Granula bezeichnet. Nach HÖLSCHER (7) und KIESER (8) sind solche Granula auch in anderen Tumorzellen zu finden und können nicht als spezifisch für Mäuseaszitеskarzinomzellen angesehen werden. Die Zahl dieser Granula wechselt von Zelle zu Zelle. Nur wenige Zellen erscheinen völlig frei, die meisten enthalten sie in unterschiedlicher Anzahl, und einige Zellen sind geradezu vollgestopft mit ihnen, sodass sie ähnlich Himbeeren aussehen. Eine Beziehung oder Abhängigkeit der Granulamenge von der Zell- oder Kerngrösse oder von anderen morphologischen Kriterien können wir nicht feststellen. Durch Färbungen der Zellen werden die Granula meist maskiert oder bei Alkoholbehandlung zerstört und durch Vakuolen ersetzt. Vakuolen, wie SEEGER (6) sie in vielen Zellen beschreibt, lassen sich ausser der Riesenva-

---

1 Bayreuther 1952
2 Levan u. Hauschka 1953
3 Schairer 1955
4 Schümmelfeder u. Wessel 1956
5 Kühne 1958
6 Seeger 1937
7 Hölscher 1951
8 Kieser 1957

kuole der Siegelringzellen in ungefärbten Zellen nicht finden. Die hell-lichtbrechenden Granula blassen in luftgetrockneten oder formalinfixierten Zellen mit der Zeit ab.

Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Giemsa oder May-Grünwald deuten auf ein gewisses Anfärbeprinzip der Zellen: kleinere Zellen besitzen häufig ein basophiles Zytoplasma mit nur wenigen Vakuolen und dunkler gefärbten granulären Strukturen. Die Färbbarkeit des Plasmas nimmt ab, je grösser die Zellen werden. Letztere erscheinen dann blasser oder gar farblos, werden oft von körnig strukturierten Säumen oder Kappen umgeben und enthalten eine grössere Anzahl von Vakuolen. Das Plasma der Siegelringzellen färbt sich meist schwach, die Riesenvakuole dagegen bleibt farblos. Viele Zellen imponieren durch Protoplasmasprosse, auch "Protuberanzen" genannt, deren Entstehung durch äussere Einflüsse, (osmotische Veränderungen), erklärt wird. Unter dem Elektronenmikroskop zeigen Tumorasziteszellen ebenfalls Protoplasma-Ausstülpungen aus der Zellmembran, welche die Untersucher (1-3) "Mikrovilli" nennen und als typisches Merkmal für Epithelzellen ansehen.

Die Kerne sind bei den kleineren Zellen kompakt, bei den grösseren aufgelockerter und nicht so intensiv gefärbt. In letzteren treten Nukleolen, in Ein- oder Mehrzahl, besonders deutlich zum Vorschein. Viele Zell- und Kernfragmente sind in den Ausstrichen zu sehen. Mitosebilder in allen möglichen typischen und atypischen Stadien finden wir zahlreich. Eine Beziehung zwischen Zellgrösse und Mitosezustand besteht nicht. Die in der Literatur angegebene Mitoserate zwischen 3-7 % (4, 5) können wir bestätigen.

Unberücksichtigt bleibt in unseren Untersuchungen die Abtrennung der Tumorzellen von weiteren Zellelementen in der Aszitesflüssigkeit, wie Peritonealdeckzellen und Entzündungszellen. Eine zuverlässige Unterscheidung ist in vielen Fällen schwer möglich (6-8). Nach verschiedenen Gesichtspunkten bisher aufgestellte Einteilungsschemen der Aszitestumorzellen (4-6, 9-11) erwiesen sich nach unseren Beobachtungen als einseitig und abhängig von dem aufgestellten Gesichtspunkt. Unsere enzymzytochemischen Untersuchungen lassen uns keine dieser Schemen übernehmen und auch kein neues aufstellen.

---

1 Wessel u. Bernhard 1957
2 Löblich u. Landschütz 1960
3 Klug 1961
4 Huth 1953
5 Kühne 1958
6 Seeger 1937, 1939 a
7 Seeger u. Schacht 1958, 1959
8 Lindahl u. Klein 1955
9 Homann 1952
10 Pirwitz et al. 1949
11 Dietrich u. Schützinger 1948

II. Zytochemie:

1.) Feulgenreaktion und Färbungen mit Methylgrün-Pyronin und Gallozyanin auf den Gehalt von Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS):

Obige zytologische Befunde werden durch zytochemische ergänzt. Das beschriebene basophile Verhalten der Kerne entspricht ihrem DNS-Gehalt, nachgewiesen durch die Feulgen-Reaktion. In nicht mit Alkohol vorbehandelten Ausstrichen reagieren nach DANNEEL und GÜTTES (1) die lichtbrechenden Granula in der Aussenfläche feulgenpositiv, was in diesem Falle sicherlich einer Plasmalreaktion entspricht; wir können in unseren Zellen ein solches Verhalten nicht bestätigen. Bei Färbungen mit Methylgrün-Pyronin fällt ein Farbumschlag der Kerne bei zunehmender Zellgrösse von bläulich nach grün auf. Mehr grünlich gefärbte Kerne erscheinen dabei aufgelockerter und lassen die Nukleolen kontrastreich erkennen, deren RNS-Gehalt durch die rötliche Färbung mit Pyronin oder durch Schwarzfärbung mit Gallozyanin dargestellt wird. Mit beiden Farbstoffen lässt sich RNS gleichzeitig im Zytoplasma nachweisen: in körnig diffuser Form vor allem in den kleineren Zellen, in den grösseren dagegen in feinen Granula, die sich besonders in die Peripherie der Zelle, auch in deren Plasmafortsätze verteilen und kappenartige oder perlschnurartige Randstrukturen bilden. Diese lichtmikroskopisch fassbaren basophilen Granula entsprechen offenbar den Ribonukleoproteid- oder PALADE-Körnchen, die bei elektronenoptischen Untersuchungen beobachtet werden (2, 3). In Asziteskarzinomzellen sollen diese in unterschiedlich dichter Anordnung teils an das spärlich entwickelte Ergastoplasma gebunden sein, teils frei und in lockerer Verteilung in der Nähe der Zellmembran liegen. RNS- und DNS-Gehalt nehmen mit zunehmender Zellgrösse ab. LANDSCHÜTZ (4) berichtet, dass mit zunehmendem Alter der Aszitestumorzellen der RNS-Gehalt im Zytoplasma absinkt. Vakuolen, artifiziell aus den lichtbrechenden Granula entwickelt, und diejenigen der Siegelringzellen sind frei von Nukleinsäuren.

2.) Lipidgehalt auf Grund der Sudanschwarzfärbung:

Lipide färben sich mit Sudanschwarz schwarzbraun. Von den Aszitestumorzellen lassen fast alle Zellen sudanpositive Granula erkennen, die zahlenmässig von Zelle zu Zelle schwanken. Diese schwarzbraunen Granula sind mit den hell-lichtbrechenden identisch (5, 6). DANNEEL und GÜTTES (1) konnten in gleichen Gra-

---

1 Danneel u. Güttes 1952
2 Wessel u. Bernhard 1957
3 Löblich u. Landschütz 1960
4 Landschütz 1950
5 Seeger 1938
6 Lindner u. v. Schweinitz 1958

nula nur mit Osmiumsäure Lipide nachweisen, bei Färbungen mit Sudan-3 stellten sich bei ihnen und bei KIESER (1) die Granula nicht dar.

3.) Kohlenhydratgehalt auf Grund der Perjodsäure-Schiff-(PAS)-Reaktion:

PAS-positiv reagieren in den Aszitestumorzellen die lichtbrechenden Granula, die sich häufig durch einen feinen intensiv roten Ring (2) aus dem diffus rötlich gefärbten Zytoplasma abheben. Eine nähere Differenzierung hinsichtlich der chemischen Grundlage dieses positiven PAS-Befundes, (Glykogen, Glykoproteide, ungesättigte Fettsäuren (3)), führten wir nicht durch.

III. Enzymzytochemie: (Vgl. Bildtafel I)

1.) Unspezifische Esterase:

Mit allen von uns angestellten Tests können wir in allen Tumorzellen Esterase nachweisen (4). Unterschiede bestehen in der Aktivitätsstärke und lassen esterase-reichere von -ärmeren Zellen trennen. In ersteren ist granulär beschaffenes Reaktionsprodukt vermehrt, die Granula sind oft recht gross, füllen die Zellen mehr oder weniger völlig aus und können sogar den Kern verdecken. Letztere dagegen besitzen weniger und kleinere Granula. Zu ihnen gehören häufig Zellen mit chromatin-armem Kern oder Protoplasmasprossen, wie umgekehrt Zellen mit chromatin-reichem Kern nicht selten auch enzymreich sind. Weitere Beziehungen zwischen Grösse oder Form der Zellen und ihrer Esterase-Aktivität können wir nicht feststellen. Die Mehrzahl der Zellen, auch Mitose- und Siegelringzellen steht zwischen beiden Extremen. Das Reaktionsprodukt lagert sich ausschliesslich im Zytoplasma in der beschriebenen Form ab und bevorzugt dabei besonders die Strukturen der lichtbrechenden Granula, sowie der Zell- und Kernmembranen (2, 5). Reaktionen im Kern selbst, wie diese FISHMAN et al. (4) beschreiben, können wir nicht erzielen. Ebenso reaktionsfrei bleibt die Vakuole in den Siegelringzellen. -

Die Esterase-Aktivität ist in den Aszitestumorzellen stets stärker als die anderer, von uns untersuchter hydrolytischer Enzyme. (Vgl. Tafel I, Abb. 1.)

---

1 Kieser 1957
2 Lindner u. v. Schweinitz 1958
3 Gedigk 1956
4 Fishman et al. 1961
5 Gropp u. Hupe 1958 c

2.) Alkalische Phosphatase:

Das Enzymbild der alkalischen Phosphatase ist, wenn auch schwächer, dem der eben beschriebenen Esterase ähnlich. Alle Zellen verhalten sich positiv und zeigen wiederum nur unterschiedliche Aktivitätsgrade. In ähnlicher Anordnung sind die Farbstoffniederschläge an die Zell- und Kernmembran (1-3) und granulär ins Zytoplasma gelagert (1), hauptsächlich auch hier in die lichtbrechenden Granula. Strukturen im Kern, von denen LINDNER und v. SCHWEINITZ (2) und FISHMAN et al. (1) nach Anwendung der Azofarbstoffmethode berichten, finden wir nur schwach und vereinzelt nach Durchführung der Kalzium-Kobalt-Methode (GOMORI), deren Ausfall im übrigen in der beschriebenen Lokalisation übereinstimmt (2). Mit letzterer Methode konnte LANDSCHÜTZ (4) keine alkalische Phosphatase in den Aszitestumorzellen nachweisen, während FISHMAN et al. (1) nach Azofarbstoffkupplung nur teilweise positive Befunde erhält. (Vgl. Tafel I, Abb. 2 u. 3.)

3.) Saure Phosphatase:

Von den vorliegenden Befunden (1, 2) können wir nur einzelne Ergebnisse bestätigen. So beobachten wir keine Aktivität saurer Phosphatase in den Kernen oder Kernmembranen, wie das LINDNER und v. SCHWEINITZ (2) und FISHMAN et al. (1) beschreiben. Auch eine schwache Reaktion der meisten Zellen (1) sehen wir nicht, sondern stellen das Gegenteil fest: in allen Zellen lässt sich granuläres, im Zytoplasma verstreutes Reaktionsprodukt finden. Dabei zeigen saure und alkalische Phosphatase in der intrazellulären Verteilung mit der auffallenden Beteiligung der lichtbrechenden Granula und in der Aktivität weitgehende Übereinstimmung. So beherrschen ebenfalls Zellen mit mässig vielen und kleineren Farbstoffgranula (1, 2) das Gesichtsfeld. Vermehrt und vergrössert sind dieselben wiederum in enzymreichen Zellen, in denen wir keine besonderen morphologischen Merkmale erkennen können. Mitose- und Siegelringzellen bleiben auch im Enzymbild der sauren und alkalischen Phosphatase unauffällig, und in den Vakuolen letzterer Zellen findet keine Reaktion statt.

Der Anteil der verstärkt enzympositiven Zellen wird bei der Esterase und bei beiden Phosphatasen auf 6-12% geschätzt. (Vgl. Tafel I, Abb. 4.)

---

1 Fishman et al. 1961
2 Lindner u. v. Schweinitz 1958
3 Gropp u. Hupe 1958 c
4 Landschütz 1950

4.) Adenosintriphosphatase (ATP-ase) und 5-Nukleotidase:

Der enzymzytochemische Nachweis mit Hilfe der bisher beschriebenen Azofarbstoffmethode besitzt gegenüber den Methoden von GOMORI den Vorteil, dass man unter dem Mikroskop die Entwicklung des Reaktionsproduktes direkt verfolgen und somit den optimalen Zeitpunkt der Inkubation bestimmen kann. Die Reaktionen nach GOMORI hingegen laufen in zwei Stufen ab: Das in erster gebildete Blei- oder Kalzium-Phosphat ist unsichtbar, und erst durch weitere Überführung in die Kobalt- oder Bleisulfidform in der zweiten Reaktionsstufe entstehen in den Zellen sichtbare Niederschläge. Wir können die Gesamtreaktion nicht unter dem Mikroskop beobachten und sind darauf angewiesen, verschiedene Inkubationszeiten auszutesten.

Bei kürzeren Zeiten, (1/2 bis zu 3 Stunden), entstehen bei beiden Enzymen uneinheitliche Zellbilder. In einigen Zellen werden nukleäre Strukturen, in gleichen und anderen Zellen zytoplasmatische Granula oder geschwärzte Kern- und Zellmembranen sichtbar. Wenige Zellen reagieren stark, viele schwach oder gar nicht. Seltenheiten bleiben Mitosezellen mit geschwärzten Chromosomen in der Meta- und Anaphase (1). Längere Inkubationszeiten, (4 Stunden und länger), verstärken den Reaktionsausfall bei beiden Enzymen mit Beteiligung aller Zellen, die sich entsprechend der Intensität des Niederschlages unschwer in drei Gruppen trennen lassen: Die erste Gruppe bilden Zellen mit starker Reaktion; Niederschläge von Sulfiden an Nukleolen- und Chromosomenstrukturen (1) im Kern fallen auf, gleichzeitig auch reichlich körniges Reaktionsprodukt im Zytoplasma. In den Zellen der zweiten Gruppe kontrastieren Zell- und Kern-membranen scharf aus einem schwächer schwarzbraun granulierten Plasma. Zur letzten Gruppe schliesslich gehören Zellen, deren Zytoplasma nur noch diffus gelbbräunlich gefärbt ist und die vereinzelt Teile der erwähnten Struktur im Kern, in den Membranen und Granula noch andeuten.

Inwieweit können wir die beschriebenen Reaktionen für den Ausdruck einer Enzymaktivität verwerten ? Bei längeren Inkubationszeiten wäre eine spontane Hydrolyse der Substrate denkbar, und die entstandenen Niederschläge wären Artefakte. LANDSCHÜTZ (1) hält nach gleichen Untersuchungen auf ATP-ase die Dauer von fünf Stunden für optimal und erhärtet seine Ergebnisse durch Kontrollreaktionen. GROPP et al. (2) weisen an Hela- und Af-Karzinomzellen zwei verschiedene ATP-spaltende Enzyme nach, die nach unterschiedlichen Inkubationszeiten sichtbar werden: Die eine ATP-ase, in der Zellmembran lokalisiert, reagiere bereits nach zehn bis zwanzig Minuten, während für die Darstellung einer weiteren, an Mitochondrien gebundenen ATP-ase zwei bis

---

1 Landschütz 1950

2 Gropp et al 1958 b

vier Stunden angegeben werden.

Uns fallen in den Aszitestumorzellen die positiven Reaktionen in den Kernen auf, welche wir bei den bisherigen Enzymen mit der Azofarbstoffmethode nicht nachweisen können (2). Gerade damit bestätigen wir die Befunde von LANDSCHÜTZ (1) , der eine Konzentration der ATP-ase besonders in den Nukleolen feststellt. Nach ihm (1) soll in älteren Tumorzellen der ATP-ase-Gehalt abfallen. Die Seltenheit, mit der auch wir nur vereinzelte Mitosezellen mit geschwärzten Chromosomen beobachten können, erklärt LANDSCHÜTZ (1) damit, dass durch längeren Aufenthalt der Zellen in einer unphysiologischen Lösung mit einem ph 7,2 [1)] die Chromosomenstruktur zerstört werden kann.

5.) DPN-H-Diaphorase:

Untersuchungen auf Diaphorase, Dehydrogenasen und Zytochromoxydase wurden an den Aszitesкarzinomzellen bereits vielfach durchgeführt (3-10). Grösstenteils können wir die vorliegenden Ergebnisse bestätigen.

Aktivität von DPN-H-Diaphorase reduziert Tetrazoliumsalze zu farbigen Formazanen. Kristallartige Formazanniederschläge sehen wir im Zytoplasma aller Zellen. Die lichtbrechenden Granula beteiligen sich ausnahmslos an dieser Reaktion. Entgegen FISHMAN et al. (10), die teilweise von schwachen Reaktionen in den Kernen berichten , lässt sich in den Kernen unserer Zellen keine Aktivität finden. Auch in den Vakuolen der Siegelringzellen lagern sich keine Formazane ab. In allen Zellen ist die Diaphorase-Aktivität mässig bis stark. Extreme Gradunterschiede fehlen. (Vgl. Tafel I, Abb. 5.)

6.) Lactatdehydrogenase (LDH):

Das Enzymbild der LDH gleicht dem der zuletzt beschriebenen DPN-H-Diaphorase völlig. Der Reaktionsausfall ist im allgemeinen etwas schwächer, wird jedoch durch Zusatz von Methylenblau zum Reduktionsprozess bei den Salzen Tetrazolblau und Tetrazolpurpur verstärkt. Das körnige Präzipitat konzentriert sich im Zytoplasma und in den lichtbrechenden Granula. Der dehydrogenasefreie Kern zeichnet sich in allen Zellen kontrastreich im Negativ ab (5, 8).

---

1 Landschütz 1950
2 Gössner 1958 a
3 Seeger 1938
4 Hölscher 1950
5 Schmitz 1950
6 Hirono 1957
7 Kieser 1957
8 Lindner u. v. Schweinitz 1958
9 Seeger u. Schacht 1959
10 Fishman et al. 1961

[1)] bei Landschütz ph 9,0

7.) Succinodehydrogenase:

Alle Zellen reagieren in gleicher Weise und Lokalisation auf Succinodehydrogenase wie auf LDH. Geringgradige Aktivitätsschwankungen von Zelle zu Zelle bestehen (1-5).

SCHMITZ (2) wies mit der THUNBERG-Methode für verschiedene Substrate aus dem Glykolyse-system und dem Zitronensäure-Zyklus, für mehrere Aminosäuren und Purine weitere Dehydrogenasen in den Aszitestumorzellen nach und bestätigt damit teilweise bereits von HÖLSCHER (3) mittels Formazandarstellung erzielte Resultate. Zu teils davon abweichenden Ergebnissen gelangt WILLIAMS-ASHMAN (6) mit biochemischen Methoden: u.a. stellt er keine Aktivität von Pyridinnucleotid-Transdehydrogenase fest.

8.) Zytochromoxydase:

In gleicher Topik und Aktivität wie die Dehydrogenasen ist Zytochromoxydase in jeder Zelle nachweisbar: Reaktionsprodukt finden wir nur im Zytoplasma, wiederum in den lichtbrechenden Granula und zusätzlichen kleineren granulären Strukturen (1, 5, 7).

Nach SEEGER und SCHACHT (7) ist die Aktivität von Zytochromoxydase in Aszitеskarzinomzellen gegenüber Exsudatzellen vermindert. Umgekehrt weisen SCHMIDT et al. (8) mit biochemischen Ergebnissen besonders auf den erhöhten Gehalt von Zytochrom C und Zytochromoxydase in Aszitestumorzellen hin.

---

1 Lindner u. v. Schweinitz 1958
2 Schmitz 1950
3 Hölscher 1950
4 Hirono 1957
5 Kieser 1957
6 Williams-Ashman 1953
7 Seeger u. Schacht 1959
8 Schmidt et al. 1955

BEFUNDE AN SOLIDEN TUMOREN

(Schnittpräparate)

I. Histologie:

Intramuskulär implantierte Aszitestumorzellen wachsen als solider Tumor infiltrierend und destruierend ins Skelettmuskelgewebe. Der Tumor besteht aus Zellen, die sich pflastersteinartig und polygonal ohne paraplastische Substanzen (1) aneinanderreihen. Die Zellen gleichen undifferenzierten Karzinomzellen im Sinne eines "Carcinoma solidum medullare". Sie sind in Grösse und Form kleiner und einheitlicher als die Ausgangszellen. Siegelringzellen sehen wir vereinzelt.

Zytologisch fallen grosse, rundlich bis oval geformte, meist exzentrisch in den Zellen gelagerte Kerne auf mit teils dichtem, teils aufgelockertem Chromatin. Sie enthalten ziemlich grosse Nukleolen. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kernes verschoben. Polykaryozyten sind zahlreich, Zellteilungsformen seltener zu finden. Das Zytoplasma besitzt einen lockeren Bau mit kleineren Vakuolen. Gleiche zyto- und histologische Eigenschaften erkennen wir in Absiedlungsmetastasen aus der Bauchhöhle, deren Zellen aber noch teilweise lichtbrechende Granula zeigen.

Vitale und nekrotische Tumoranteile gehen oft unscharf ineinander über. Nekrobiotische Zonen mit Kernregressionen (Pyknose und Karyorrhexis) zeichnen sich durch die basophile Kerntrümmerzone meist deutlicher ab (1). In nekrotischen Bereichen liegen auch vereinzelt Zellen mit gut erhaltenen Kernstrukturen, bei denen es sich häufig um eingewanderte Histiozyten handelt. Nicht selten grenzt reaktiv neugebildetes Bindegewebe mit Kapillarsprossung das Tumor- vom benachbarten Gewebe ab.

II. Enzymhistochemie: (Vgl. Bildtafeln II-IV)

1.) Unspezifische Esterase:

Wie in den Asziteskarzinomzellen können wir ebenfalls in den solid wachsenden Tumorzellen von allen hydrolytischen Enzymen Aktivität unspezifischer Esterase am stärksten nachweisen. Wir finden reichlich Reaktionsprodukt in vitalen Bereichen, in denen besonders einzelne und grössere, sehr enzymstarke Zellen auffallen. In den Nekrosen nimmt die Aktivität gegen das Zentrum zu ab. Ver-

---

1 Kühne 1958

stärkt ist die Reaktion ferner in nekrobiotischen Randsäumen und in den angrenzenden Reaktions- bzw. Bindegewebszonen. In ungeschädigten Tumorzellen sehen wir die mehr diffus beschaffenen Farbstoffniederschläge im Zytoplasma abgelagert, in den Karzinomzellen aus der Bauchhöhle hauptsächlich in den lichtbrechenden Granula. Dagegen beobachten wir in geschädigten und abgestorbenen Zellen grobkörnige Präzipitate, die scheinbar nicht mehr strukturgebunden, sich regellos in diese Zellen verstreuen.

2.) Saure Phosphatase:

Aktivität der sauren Phosphatase steht derjenigen der Esterase nicht viel nach. Saure Phosphatase lässt sich auch in fast allen ungeschädigten Krebszellen nachweisen: in vielen Zellen in Form kleiner Granula, in den übrigen durch massiven Nierderschlag im Zytoplasma. Starke Reaktionen weisen oft infiltrierend wachsende Zellen auf. Nekrosen hingegen verhalten sich negativ, und wir finden in ihnen mosaikartig verteilte, sehr enzymreiche Histiozyten. Die Aktivität der sauren Phosphate ist in den Randteilen der nekrobiotischen Zonen und auch der angrenzenden Reaktionsgebiete meist so intensiv, dass eine nähere Differenzierung nicht mehr möglich ist. (Vgl. Tafel II, Abb. 6-8, Tafel III, Abb. 9-11.)

3.) Adenosintriphosphatase (ATP-ase):

Ebenso stark wie bei der sauren Phosphatase ist die Reaktion der ATP-ase in Übergangszonen nekrobiotischer und bindegewebiger Anteile mit zackigen und unregelmässigen Grenzen. Von ihnen aus erstrecken sich ausläuferartig enzymstarke Zellen und Zellgruppen in die benachbarten Bereiche und tief ins Zentrum der Nekrosen. Aus den vitalen Tumorgebieten reagieren nur vereinzelte, fleckförmig angeordnete Zellen positiv. Als stark ATP-ase-aktiv fallen die Kapillaren auf.

4.) Alkalische Phosphatase:

Aktivität alkalischer Phosphatase können wir in den verschiedenen Tumorbereichen nicht nachweisen. Stärker reagieren Bindegewebszellen und Gefässwände, besonders die Kapillaren. (Vgl. Tafel III, Abb. 12.)

5.) 5-Nukleotidase:

Alle durchgeführten Reaktionen ergeben keine positiven Befunde.

6.) DPN-H-Diaphorase und Succinodehydrogenase:

Reaktionen auf diese beiden Enzyme führen zu den besten Enzymmustern. Das der DPN-H-Diaphorase ist dabei dem der Succinodehydrogenase recht ähnlich. Der Aktivitätsgrad beider Enzyme entspricht dem Vitalitätsgrad der Tumorzellen. In ungeschädigten Karzinomzellen sehen wir reichliche Farbstoffniederschläge, in geschädigten Zellen sind diese geringer und fehlen in nekrotischen. Gleichzeitig stellen wir eine Dislokation des Reaktionsproduktes wie bei der Esterase fest: In Zellen vitaler Bezirke ist das Zytoplasma unter Kernfreilassung völlig damit ausgefüllt , in regressiv veränderten Zellen nekrobiotischer Zonen dagegen kommt es zur körnigen Auflösung und unregelmässigen Verteilung der Präzipitate. Dadurch fallen diese Zonen, vor allem bei der Succinodehydrogenase, stets besonders auf. Meist ist der Reaktionsausfall bei der Succinodehydrogenase schwächer als bei der DPN-H-Diaphorase, wird aber durch Zusatz von Menadion verstärkt (1). (Vgl. Tafel IV, Abb. 13-15.)

Die übrigen Gewebebestandteile, (Muskel-, Binde-, Fett-, Nerven-, Knorpel- und Knochen-gewebe, Gefässe, Leber, Milz, Pankreas, Ovar), zeigten in den von uns untersuchten Enzymen kein unterschiedliches Verhalten gegenüber den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen.

---

1 Wattenberg u. Leong 1960

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die von uns zytochemisch untersuchten Enzyme unspezifische Esterase, alkalische und saure Phosphatase, Adenosintriphosphatase, 5-Nukleotidase, DPN-H-Diaphorase, Lactatdehydrogenase, Succinodehydrogenase und Zytochromoxydase lassen sich in allen Aszitestumorzellen nachweisen. Davon abweichende Ergebnisse anderer Autoren haben wir bereits in unseren Befunden erwähnt. Hinsichtlich Topik und Aktivität verhalten sich diese Enzyme in allen Zellen ähnlich. Im Zytoplasma aller Zellen kommt es zur granulären Ablagerung des Reaktionsproduktes mit Bevorzugung der grossen lichtbrechenden Granula. Nach GUSEK und LINDNER (1) finden sich Azofarbstoffpräzipitate vorwiegend an vorgebildeten Strukturen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, sowie an kleinen und grossen Mitochondrien. Demnach liessen sich unsere Befunde als Enzymaktivität an granulären Zellstrukturen deuten.

Von diesen erscheinen uns die hell-lichtbrechenden Granula besonders interessant. Sie enthalten Lipide und PAS-positive Substanzen (2-5) und beteiligen sich intensiv an jeder Enzymreaktion (3, 5, 6-10). Von LIPSCHÜTZ (11) ähnliche hellglänzende Granula an anderen Transplantationstumoren zuerst beschrieben und von ihm als Ausdruck einer Zellschädigung angesehen, wurden sie später in Beziehung zu Mitochondrien gesetzt. LETTRÉ (12) und SEYFARTH (13) sprachen diese Granula sogar als infektiöses Agens des Mäuseaszitestumors an. SEEGER et al. (2, 9) halten die lichtbrechenden Granula in den Aszitescarzinomzellen nach ihrem Verhalten auf verschiedene Vitalfärbungen und zytochemischen Reaktionen für degenerierte Mitochondrien und sehen darin den Angriffspunkt der karzinogenen Entartung. HÖLSCHER (6) setzt sie auf Grund ihrer reduzierenden Eigenschaft von TTC [1] ausschliesslich mit Mitochondrien gleich, während KIESER (8) in den Granula eine Erscheinung funktionellen Formwechsels erblickt, wobei fädige Mitochondrien, kleine und grosse Granula ineinander übergehen können. LINDNER und v. SCHWEINITZ (5) beobachten bei enzymzytochemischen Untersuchungen an lebenden Zellen erst beim Absterben derselben eine Dislokation des Formazans von TTC in die lichtbrechenden Granula und rechnen sie teilweise dem Golgi-Apparat zu. Unterstützt KIESER (8) diese Beobach-

---

1 Gusek u. Lindner 1959
2 Seeger 1937-1950
3 Danneel u. Güttes 1952
4 Huth 1953
5 Lindner u. v. Schweinitz 1958
6 Hölscher 1951
7 Hirono 1957
8 Kieser 1957
9 Seeger u. Schacht 1959
10 Fishman et al. 1961
11 Lipschütz 1929: zit. bei Kieser
12 Lettré 1950
13 Seyfarth 1952: zit. bei Kieser

[1] Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

tung mit dem Hinweis der grossen Lipoidlöslichkeit von Formazanen, welhalb eine Anreicherung des Farbstoffes in den Granula möglich sei, ohne dass sich die enzymatische Reduktion am gleichen Ort abgespielt habe, so überzeugen doch seine und unsere Reaktionen mit Tetrazoliumsalzen [1)], deren Formazane lipoidunlöslich sind, von der autochthonen Enzymaktivität in den lichtbrechenden Granula. DANNEEL und GÜTTES (1) sprechen sich gegen die Mitochondriennatur der Granula aus, weil sie auf Färbungen mit Janusgrün oder Säurefuchsin farblos bleiben.

Nach zahlreichen elektronenmikroskopischen Beobachtungen (2-11) wird übereinstimmend berichtet, dass die Mitochondrien in Tumorasziteszellen auffallend stark in Grösse, Struktur und Form variieren. Riesenmitochondrien, oft in Zellen mit grossen Zellkernen (10), mit teils erhaltenen, teils regressiven Strukturen, (Schwellung, Unregelmässigkeit und Fehlen der "Cristae"), werden beschrieben. Grosse geschädigte Mitochondrien sollen nach WOLF (9) elektronendichte Einschlüsse enthalten, die er für verklumpte "Cristae" hält; an deren Lipoproteide kann es sekundär zu einer Anlagerung von Enzymen kommen. Der Golgi-Apparat sei in den Zellen unterschiedlich entwickelt. Einige Untersucher (4, 5, 7, 9, 10) erwähnen ausserdem 50-70 mμ grosse, von einer Membran umschlossene Partikel im Zytoplasma von unterschiedlicher Struktur, die einige der Autoren für Viruspartikel ansehen.

Es erscheint uns auf Grund unserer Befunde in diesem Zusammenhang auffällig, dass in den lichtbrechenden Granula sowohl mitochondrienspezifische Enzyme (z.B. Succinodehydrogenase), als auch lysosomenspezifische Enzyme (z.B. saure Phosphatase (12)) gleichzeitig nachweisbar sind. Dieses Verhalten spricht unseres Erachtens dafür, dass diese Granula nicht ohne weiteres mit präexistenten Zellorganellen in ihrer Enzymausrüstung verglichen werden können.

Menge und Grösse der Reaktionsgranula bestimmen die Enzymaktivität der Zelle. Hydrolytische Enzyme zeigen regelmässig in einigen Zellen, deren Häufigkeit zwischen 6-12 % schwankt, eine erhöhte Aktivität (13). Morphologisch sind solche Zellen nicht von den übrigen zu unterscheiden, (abgesehen von den

---

1 Danneel u. Güttes 1952
2 Landschütz u. Kausche 1951
3 Selby et al. 1956
4 Adams u. Prince 1957
5 Wessel u. Bernhard 1957
6 Braun 1958
7 Yasuzumi u. Sugihara 1958
8 Gusek u. Lindner 1959
9 Wolf 1959
10 Löblich u. Landschütz 1960
11 Klug 1961
12 Gössner 1960
13 Lindner u. v. Schweinitz 1958

[1)] Kieser: Stilben TC wir: Nitro BT

wenigen Zellen mit einer Vielzahl lichtbrechender Granula, die ständig verstärkt enzympositiv reagieren). Treten in diesen Zellen alle Enzyme vermehrt auf, oder sind phosphatase- von esterase-reichen Zellen zu trennen ? Wie können wir diese auffallend enzymaktiven Zellen funktionell interpretieren ? Sind es Zellen mit gesteigertem Stoffwechsel oder intensiviertem Wachstum (2) ? Mitosezellen geben darüber keine Auskunft: sie besitzen wechselnde Aktivitäten (3). Oder sollte das Umgekehrte zutreffen: Hinweis beginnender Regression und Autolyse (4-7) ? Zugrundegehende, solid wachsende Krebszellen reagieren in unseren Untersuchungen auf Esterase, saure Phosphatase und ATP-ase in ähnlicher Weise verstärkt. Jedoch lassen im Aszitestumor Siegelring- und viele geschädigte Zellen eine entsprechende gesteigerte Aktivität vermissen. Inwieweit kann der Altersfaktor der Zelle ausschlaggebend sein (6, 8, 9) ? Diese Frage liessen wir ausser acht, indem wir stets acht bis zehn Tage alten Tumoraszites verwandten.

Im Zellkern können wir mit Hilfe der Azofarbstoffmethode keine Enzyme nachweisen (10). Nur an der Kernmembran sind Reaktionen auf Esterase und alkalische Phosphatase sichtbar (1, 11). LINDNER und v. SCHWEINITZ (1) und FISHMAN et al. (11) beschreiben ebenfalls saure Phosphatase in der Kernmembran. Von diesen Autoren erzielte Reaktionen in den Kernen (Esterase, alkalische und saure Phosphatase) erklären wir damit, dass LINDNER und v. SCHWEINITZ (1) an supravitalen, unfixierten Zellen gearbeitet haben, während FISHMAN et al. (11) eine von der unseren verschiedene Fixierung und Einbettung[1)] anstellten. Auch differieren bei den Untersuchern die Milieuverhältnisse. FISHMAN et al. (11) berichten sogar von DPN-H-Diaphorase in den Kernen: umgekehrt ist bekannt, dass Zellkerne nie wasserstoff-übertragende Enzyme enthalten. Unterschiedlich dagegen sind die Niederschläge zu beurteilen, die wir mit den Methoden nach GOMORI (12) und WACHSTEIN und MEISEL (13) erreichen konnten, (alkalische Phosphatase, ATP-ase, 5-Nukleotidase). Wir haben schon in unseren Befunden auf die Bedeutung der Inkubationszeit bei diesen Methoden und auf die Möglichkeit der Artefaktbildung durch spontane Hydrolyse der Substrate hingewiesen. Andererseits hat die Biochemie ATP-ase in Zellkernen

---

1 Lindner u. v. Schweinitz 1958
2 Löblich u. Landschütz 1960
3 Gropp et al. 1957
4 Braun 1958
5 Wolf 1959
6 Seeger 1937, 1938, 1939 a
7 Seeger u. Schacht 1958, 1959
8 Landschütz 1950
9 Kieser 1957
10 Gössner 1958 a
11 Fishman et al. 1961
12 Gomori 1953
13 Wachstein u. Meisel 1957

1) Fixierung durch Chloralhydrat und Einbettung in Gelatine

nachgewiesen, und gleichfalls biochemisch stellen SCHÜMMELFEDER et al. (1) in den Kernen der Aszitestumorzellen alkalische Phosphatase und ATP-ase fest, starke Aktivität von saurer Phosphatase dagegen im Zytoplasma. Eine weitere Übereinstimmung zwischen unseren zytochemischen Befunden und denen der Biochemie erblicken wir in dem Ergebnis von ACS et al. (2), die eine an der Zelloberfläche wirksame ATP-ase beobachten.

Welche Schlussfolgerungen in funktioneller Hinsicht lassen sich aus diesen Phosphatase-Befunden ziehen ? Ein Überblick zeigt, dass die Ansichten darüber keineswegs eindeutig sind. Während SCHÜMMELFEDER et al. (1) und LAND-SCHÜTZ (3) Zusammenhänge zwischen ATP-ase und Teilung und Wachstum der Zelle suchen, sprechen GROPP et al. (4) diesem Enzym auf Grund seiner Oberflächenlokalisation an Af- und Hela-Karzinomzellen mehr Bedeutung für die Formerhaltung, Motilität und Kontraktilität der Zelle zu. Im Zusammenhang zum Glykolyse- und Phosphat-stoffwechsel der Zellen stehen nach SCHÜMMEL-FEDER et al. (1) ihre Ergebnisse, nach denen in Aszitеskarzinomzellen die saure Phosphatase die alkalische überwiege. Dem entgegengesetzt stellt DOMAGK (5) in Transplantationstumoren eine gesteigerte Aktivität alkalischer Phosphatase im Zytoplasma, sowie im Kern fest. DOMAGK (5) und LANDSCHÜTZ (3) vermuten eher einen Zusammenhang zwischen den Phosphatasen und dem Nukleinsäurestoffwechsel der Zelle.

Solid wachsende Tumorzellen weisen gegenüber ihren im Aszitesmilieu lebenden Zellen grosse morphologische (6) und enzymatische Unterschiede auf. Gewisse Übergänge zwischen beiden Formen können wir in den Zellen feststellen, die sich von den Aszitestumorzellen absiedeln und im Verband im Peritoneum und in den Bauchorganen weiter wachsen. Zellen dieser Metastasen besitzen häufig noch lichtbrechende Granula, verhalten sich jedoch in ihrer Gesamtheit auf die Enzymreaktionen wie die intramuskulär implantierten Tumorzellen. Die von uns untersuchten Blastomgewebe unterscheiden sich von den Ausgangszellen nicht nur durch das Fehlen einiger Enzyme, sondern auch die nachgewiesenen Enzyme schwanken beträchtlich in ihrer Aktivität in den einzelnen Tumoranteilen: das relativ einheitliche Enzymbild der Aszitеskarzinomzellen ist aufgehoben.

Positive Reaktionen können wir in den soliden Tumoren auf DPN-H-Diaphorase, Succinodehydrogenase und von den hydrolytischen Enzymen nur auf Esterase, saure Phosphatase und ATP-ase erzielen. Alkalische Phosphatase und 5-Nukleotidase hingegen können wir nicht nachweisen. Von den hydrolytischen Enzymen ist die Aktivität der Esterase am stärksten und nimmt stufenartig wie

---

1 Schümmelfeder et al. 1954
2 Acś et al. 1954
3 Landschütz 1950
4 Gropp et al. 1958 b
5 Domagk 1956
6 Wessel u. Bernhard 1957

die der DPN-H-Diaphorase und der Succinodehydrogenase entsprechend dem Vitalitätsgrad der Zellen gegen das Zentrum von Nekrosen zu ab. Die meisten dieser Enzyme reagieren in schmalen nekrobiotischen Randzonen, in Kapillaren und Histiozyten verstärkt. In gleichen nekrobiotischen Randzonen wird das Reaktionsprodukt in ungleichmässiger Verteilung und grobkörniger Ausflockung in den Zellen sichtbar, während es in ungeschädigten Zellen mehr diffus das Zytoplasma völlig ausfüllt. Nekrotisierende Zellgruppen aus diesen Zonen werden bei den Reaktionen nach GOMORI auf saure Phosphatase und ATP-ase intensiv geschwärzt. Wie können wir diese verstärkten Reaktionen in den nekrobiotischen Anteilen deuten ? Sind sie Ausdruck autolytischer Vorgänge in den Zellen ? Ist die beschriebene Dislokation des Reaktionsproduktes in gleichen Zellen als eine Herauslösung der Enzymorte (Mitochondrien, Lysosomen) aufzufassen ? Wie können wir jene Zellen interpretieren, die vereinzelt in vitalen Gebieten verstärkt reagieren? Bestehen Zusammenhänge zwischen ihnen und den enzymreichen Aszitestumorzellen ? Bereits GROPP et al. (1) haben in Gewebekulturen auf unterschiedliche Reaktionen morphologisch gleicher Zellen auf ein und dasselbe Enzym hingewiesen. Genauer untersucht ist das Verhalten reaktivneugebildeten Bindegewebes (2), in dem wir ebenfalls bei den meisten Enzymen verstärkte Aktivität feststellen können. Histiozytäre Zellen sollen, wenn sie zu reaktiven Leistungen gereizt werden, adaptiv reichlich Enzyme bilden können (2, 3). Die starke Aktivität, besonders von ATP-ase und alkalischer Phosphatase, in den Kapillaren könnte in gleicher Richtung gesteigerten Reizes und Stoffwechsels erklärt werden.

Wie können wir das verschiedene enzymatische Verhalten beider Tumorformen verstehen, das wir zur Übersicht unten nocheinmal tabellarisch (Tabelle 2) gegenüberstellen ? Der Stoffwechselzustand der Zelle ist im Komplex abhängig von: der Sauerstoffversorgung, dem Zustrom von Substraten und Co-Faktoren, dem Einfluss von Hemmstoffen, der Strukturverteilung der Enzyme und von regressiven oder progressiven Veränderungen innerhalb der Zelle. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (4) zeichnen sich implantierte, im Verband wachsende Karzinomzellen gegenüber ihren im Aszitesmilieu lebenden Zellen durch ein höher differenziertes Ergastoplasma und eine grössere Zahl von Mitochondrien aus. Höher differenzierte zytologische Strukturen solid wachsender Zellen fordern jedoch höher differenzierte histologische Strukturen des gesamten Gewebsverbandes und sind an das Vorhandensein ernährender Gefässe gebunden. Im vorliegenden Blastomgewebe dagegen ist die Gefässneubildung

---

1 Gropp et al. 1957
2 Gedigk u. Bontke 1957
3 Gropp u. Hupe 1958a
4 Wessel u. Bernhard 1957

spärlich (1) , wodurch der Wirkungsgrad oben aufgezählter Faktoren ungewiss und unsicher wird. Die Zellen setzen sich von vornherein durch ihre Wachstumstendenz in Widerspruch zu ihrer Versorgung. Umgekehrt bilden Aszitestumorzellen nach der Begriffsbestimmung kein Gewebe: die Einzelzelle steht im Vordergrund und lebt autonom. Alle Zellen im Aszites wachsen milieumässig unter gleichen Voraussetzungen. Wir können nicht entscheiden, inwieweit die Aszitesflüssigkeit obige Bedingungen erfüllt. Auch wissen wir nicht, in welchem Ausmass sich die Zelle an ihre Umgebung anpassen kann, welche Wechselwirkungen zwischen Milieu und Anpassungsfähigkeit der Zelle bestehen und inwieweit das eine Rolle auf die Enzymausstattung und -aktivität in der Zelle spielt. Solange wir diese Fragen nicht beantworten können, möchten wir uns den Überlegungen von WESSEL und BERNHARD (2) anschliessen. Dieselben (2) deuten ihre zytologischen Befunde teils mit Begriffen der Adaption, teils mit solchen der Selektion und Stammzelltheorie von MAKINO (3), nach der genetische Faktoren ausschlaggebend sind (4, 5).

---

1 Kühne 1958
2 Wessel u. Bernhard 1957
3 Makino 1956
4 Klein u. Klein 1956
5 Schümmelfeder 1954

Tabelle 2

Gegenüberstellung der Enzymbefunde an Aszitestumorzellen und an solid wachsenden Karzinomzellen

Enzym	Aszitestumorzellen		solide Tumoren		
	gewöhnlich	enzymstark	vital. Bez.	nekrobiot. Zone	nekrot. Bez.
Esterase	+ granulär	+ + zytoplasmat.	+ (+) diffus bis	+ + granulär	(+)
Alkalische Phosphatase	+ granulär (Kern)	+ + zytoplasmat.	0	0	0
Saure Phosphatase	+ granulär	+ + zytoplasmat.	(+) diffus bis	+ (+) granulär	0
ATP-ase	+ granulär und Kern	+ + zytoplasmat.	(+) diffus bis	+ (+) granulär	(+)
5-Nukleotidase	+ granulär und Kern	+ + zytoplasmat.	0	0	0
DPN-H-Diaphorase	+ granulär	+ (+) zytoplasmat.	+ + diffus bis	+ (+) granulär	(+)
LDH	+ granulär	+ (+) zytoplasmat.	nicht untersucht		
Succinodehydrogenase	+ granulär	+ (+) zytoplasmat.	+ diffus bis	+ (+) granulär	(+)
Zytochromoxydase	+ granulär	+ (+) zytoplasmat.	nicht untersucht		

++ : starke Aktivität
(+) : fragliche Aktivität
+ : mässige Aktivität
0 : keine Aktivität

ZUSAMMENFASSUNG

Mit enzymhistochemischen Methoden, (Azofarbstoff-, Bleiphosphat-, Kalzium-Kobalt-Methode, Tetrazoliumsalzen und einer modifizierten Nadi-Reaktion), werden folgende Zellen auf ihre Aktivität an Esterase, alkalische und saure Phosphatase, ATP-ase, 5-Nukleotidase, DPN-H-Diaphorase, LDH, Succinodehydrogenase und Zytochromoxydase untersucht: freie Aszitestumorzellen der Maus, von ihnen in den Bauchorganen abgesiedelte und im Verband wachsende Zellen, sowie ein solider Tumor, der durch intramuskuläre Implantation von Aszitestumorzellen in den Oberschenkel der Maus erzeugt wurde.

Alle Aszitestumorzellen reagieren auf die aufgezählten Enzymreaktionen positiv. Das Reaktionsprodukt verteilt sich granulär ins Zytoplasma. Kernreaktionen sind nur auf alkalische Phosphatase, ATP-ase und 5-Nukleotidase zu erzielen. Diese Befunde werden mit anderen zytologischen, zytochemischen, enzymzytochemischen und biochemischen Ergebnissen verglichen. Auffallend enzymaktive Zellen und grosse lichtbrechende Granula, die sich in den Aszitestumorzellen sudan-, PAS- und stark enzym-positiv verhalten, stehen im Mittelpunkt der Diskussion.

In solid wachsenden Karzinomzellen sind dagegen alkalische Phosphatase und 5-Nukleotidase nicht nachweisbar. Die Aktivität der übrigen Enzyme schwankt zwischen einzelnen Tumorzonen erheblich, und gleichzeitig fällt die reichliche Enzymausstattung histiozytärer Zellen und Kapillaren auf. Möglichkeiten für das unterschiedliche Verhalten beider Tumorformen werden besprochen.

Herrn Dozent Dr. W. Gössner danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die kritische Betreuung während der Durchführung derselben.

Gleichzeitig gilt mein Dank Frau Gerwit Frisch für ihre zuverlässige, technische Hilfe bei der Anfertigung der Präparate.

Legenden zu den Abbildungen. (1)

Tafel I : Aszitestumorzellen.

I. Abb. 1 Esterase. (As-D-Azetat, Zelle ohne Kernfärbung.) Granuläre Reaktion, vorwiegend in den grossen lichtbrechenden Granula. Vergrösserung 1000 mal.

I. Abb. 2 Alkalische Phosphatase. (Naphthol-As-D-Phosphat, Kerndarstellung durch Feulgen.) Grössere Zelle mit stärkerer Reaktion. Aktivität besonders in den lichtbrechenden Granula und an der Zellmembran. Vergrösserung 1000 mal.

I. Abb. 3 Alkalische Phosphatase. (Naphthol-As-D-Phosphat, keine Kernfärbung.) Mehrere Zellen mit geringer bis mittlerer Aktivität in den lichtbrechenden Granula und an der Zellmembran. Vergrösserung 1000 mal.

I. Abb. 4 Saure Phosphatase. (Naphthol-As-D-Phosphat, Kerndarstellung durch Feulgen.) Zelle mit stärkerer Aktivität in granulärer Anordnung (lichtbrechende Granula). Vergrösserung 1000 mal.

I. Abb. 5 DPN-H-Diaphorase. (Nitro BT, keine Kerndarstellung.) Grosse Zelle mit starker Reaktion. Der Niederschlag des Formazans füllt das Zytoplasma völlig aus und schlägt sich ringförmig um den Kern, der sich kontrastreich im Negativ abzeichnet. Vergrösserung 1000 mal.

Tafel II : Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation.
Saure Phosphatase.

II. Abb. 6 Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation. Saure Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin.) Tumorzellen reagieren unterschiedlich: teils mit geringerer granulärer, teils mit massiver Sulfid-Ablagerung. Vergrösserung 400 mal.

II. Abb. 7 Saure Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin.) Randgebiet zwischen Tumor und Muskulatur. Besonders stark ist die Aktivität in den spindelförmigen tief geschwärz-Histiozyten, die sich in der Grenze zwischen Tumor- und Muskel-gewebe häufen. Gleichzeitig starke Reaktion in interstitiellen Zellen der Muskulatur und in den Endothelien einer Kapillare (links). Vergrösserung 100 mal.

II. Abb. 8 Saure Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin.) Vergrösserter Ausschnitt aus Abbildung 7. Die spindelförmigen Histiozyten erscheinen völlig in ihrem Zytoplasma geschwärzt, während die benachbarten Tumorzellen nur vereinzelte Granula aufweisen. Vergrösserung 400 mal.

Tafel III : Abb. 9-10 Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation. Saure Phosphatase

III. Ab. 9 Saure Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin). Übersicht über ein Tumorgebiet mit einer Nekrose im Zentrum, die von einer schmalen nekrobiotischen Zone vom vitalen Anteil getrennt wird. In den ungeschädigten Zellen schwankt die Aktivität, die in der nekrobiotischen Zone verstärkt ausfällt. Ausläuferartig erstrecken sich noch einige enzymaktive Zellen in die sonst reaktionsfreie Nekrose. Vergrösserung 100 mal.

III. Abb.10 Vergrösserter Ausschnitt aus Abbildung 9. Rechts ungeschädigte Tumorzellen mit feingranulären Niederschlägen. Links Nekrose, in der Mitte nekrobiotische Zone mit intensiv geschwärzten Zellen, die sich teilweise noch in den nekrotischen Bereich fortsetzen. Vergrösserung 400 mal.

III. Abb.11 Solider Tumor aus der Bauchhöhle. Saure Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin). Ins mesenteriale Fettgewebe infiltrierende Tumorzellen. Die Randzone, in der die Tumorzellen ans Fettgewebe grenzen, zeigt verstärkt phosphatase-aktive Zellen. Vergrösserung 100 mal.

III. Abb.12 Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation. Alkalische Phosphatase (nach Gomori, Kryostatschnitt, Kernfärbung mit Hämatoxylin). Randgebiet zwischen Tumor (links oben) und Muskulatur (rechts unten). Während im Tumorbereich und im Muskelgewebe keine Enzymaktivität zu sehen ist, reagiert allein die Reaktionszone am Tumorrand. Vergrösserung 100 mal.

Tafel IV : DPN-H-Diaphorase

IV. Abb.13 Solider Tumor aus der Bauchhöhle. DPN-H-Diaphorase (Nitro BT, Kryostatschnitt, keine Kernfärbung). Starke Enzymaktivität im Zytoplasma aller Tumorzellen. Vergrösserung 400 mal.

IV. Abb.14 Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation. DPN-H-Diaphorase. (Nitro BT, Kryostatschnitt, keine Kernfärbung.) In die Muskulatur infiltrierende Tumorzellen mit starker Reaktion im Zytoplasma. Im verbliebenen Sarkoplasma ebenfalls fibrilläre Farbstoffniederschläge. Vergrösserung 400 mal.

IV. Abb.15 Solider Tumor nach intramuskulärer Implantation. DPN-H-Diaphorase. (Nitro BT, Kryostatschnitt, keine Kernfärbung.) Randzone einer Nekrose (rechts). Während das Zytoplasma ungeschädigter Tumorzellen reichlich Formazan aufweist (links), sind die nekrotischen Zellen beinahe frei davon (rechts). Vergrösserung 400 mal.

TAFEL 1

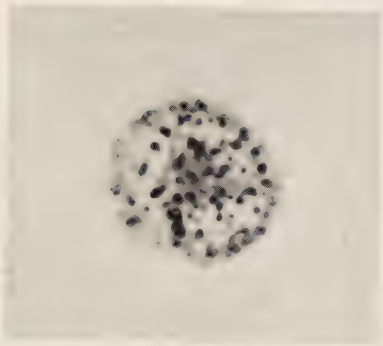

Abb.1

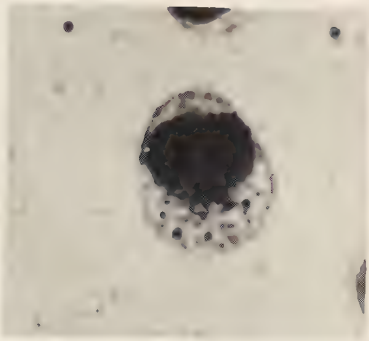

Abb. 2

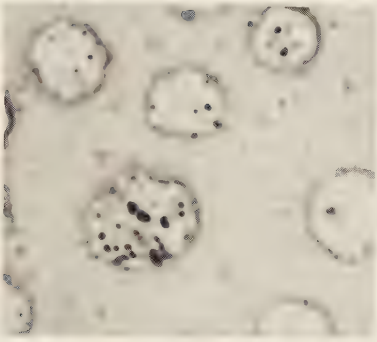

Abb.3

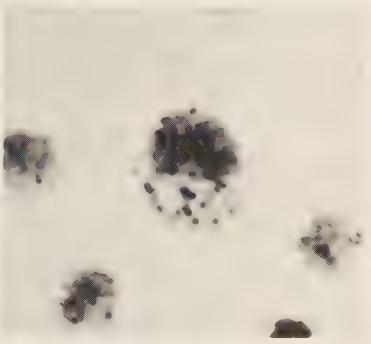

Abb.4

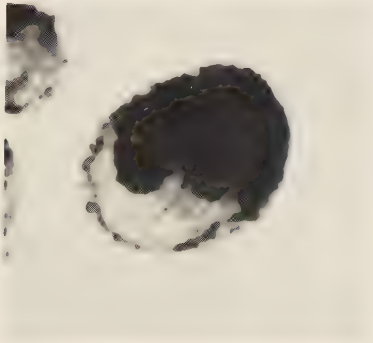

Abb.5

TAFEL 2

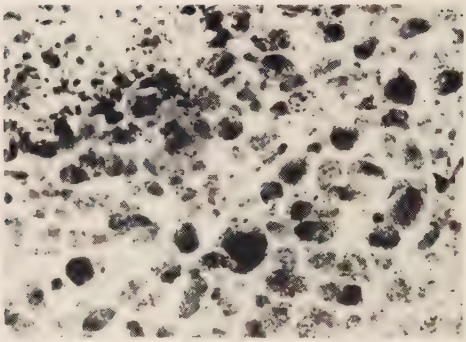

Abb. 6

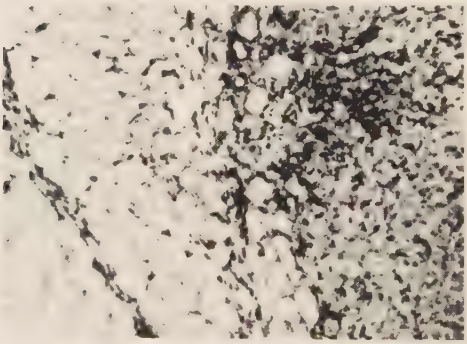

Abb. 7

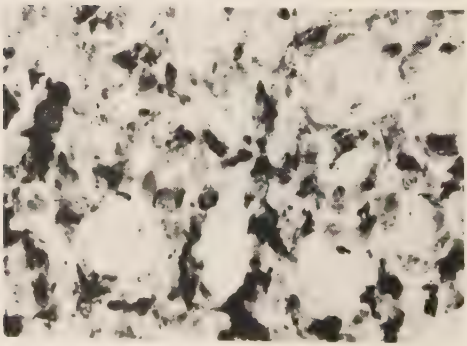

Abb. 8

TAFEL 3

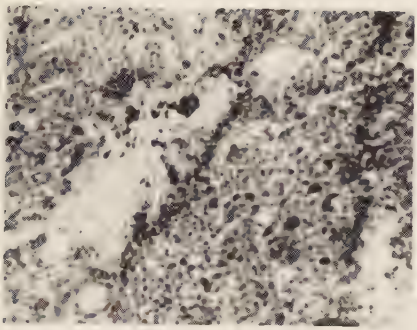

Abb. 9

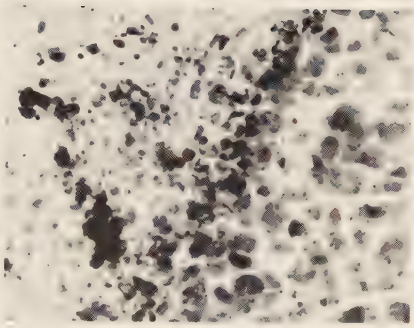

Abb. 10

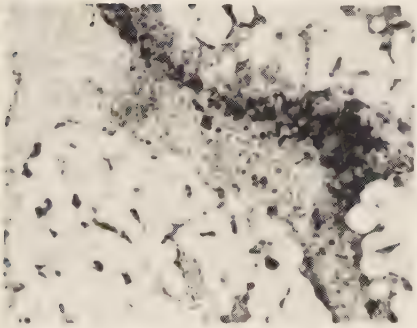

Abb. 11

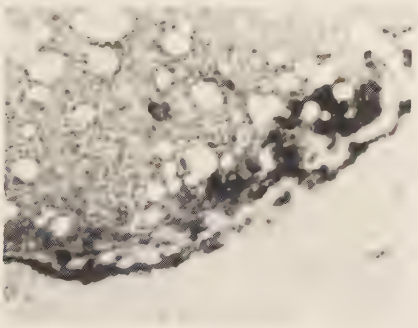

Abb. 12

TAFEL 4

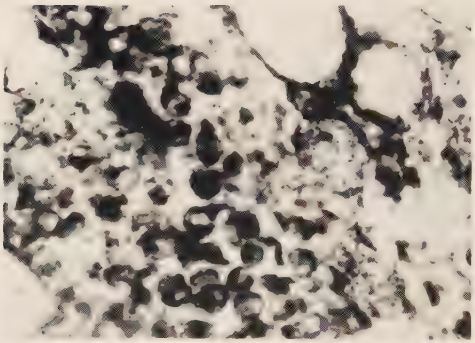

Abb.13

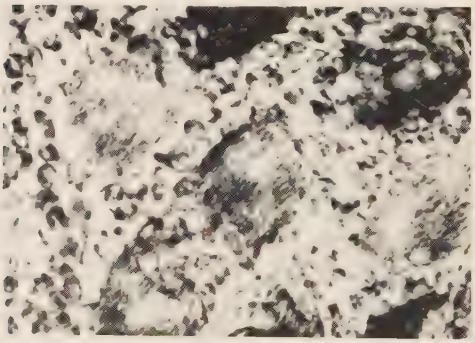

Abb.14

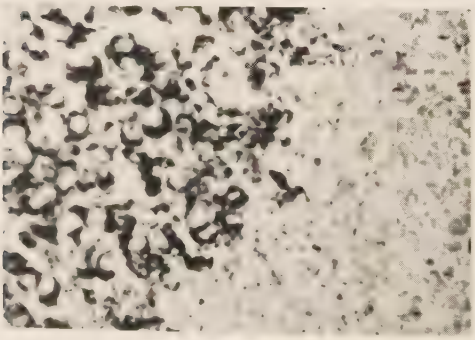

Abb.15

LITERATUR

Acs, G., W. Ostrowski und F.B. Straub, Über die Adenylpyrophosphatase-Aktivität an der Oberfläche der Asciteskrebszellen.
Acta physiol. (Budapest) 6, 261, 1954

Adams, W. and A. Prince, An electron microscope study of the morphology and distribution of the intracytoplasmic "virus-like" particles of Ehrlich ascites tumor cells.
J. biophys. biochem. Cytol. 3, 161, 1957

Barnett, R.J. and A.M. Seligman, Histochemical demonstration of esterases by production of indigo.
Science 114, 579, 1951

Bayreuther, K., Chromosomenbestand des Ehrlichschen Ascitestumors der Maus.
Z. Naturforsch. 7b, 554, 1952

Braun, H., Elektronenoptische Untersuchungen an Ehrlichschen Mäuseascites-Tumorzellen.
Arch. Geschwulstforsch. 14, 1, 1958

Chance, B. and La Roy N. Castor, Some patterns of the respiratory pigments of ascites tumors of mice.
Science (Lancaster, Pa.) 116, 200, 1952

Danneel, R. und E. Güttes, Über die Plasmastrukturen der Ascitestumorzellen.
Naturwiss. 39, 331, 1952

Dietrich, A. und L. Schützinger Resistenz gegenüber Doppelimpfung von Ascites-carcinom der Maus.
Z. Krebsforsch. 56, 121, 1948

Dittmar, C. und H. Maas, Cytologische Studien an Tumorzellen des Mäuse-Ascites.
Z. Krebsforsch. 55, 109, 1944

Domagk, G., Experimentelle Geschwülste.
Handbuch d. Allgem. Pathol. 6/3, 273, 1956

Farber, E., W.H. Sternberg and C.E. Dunlap, Histochemical localization of specific oxidative enzymes. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 254, 1956

Fishman, W.H., K.T. Ladue and P.R.F. Borges, Enzymorphology: A Study of Free Cells.
J. Histochem. Cytochem. 9, 424, 1961

Gedigk, P., Histochemische Methoden.
im Biochem. Taschenbuch von H.M. Rauen, Springer-Verlag 1956

Gedigk, P. und E. Bontke, Über die Enzymaktivität im Fremdkörpergranulationsgewebe.
Virchows Arch. 330, 538, 1957

Gössner, W., Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. (Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren.)
Histochemie 1, 48, 1958 (a)

Gössner, W., Methoden der Enzymhistochemie und ihre Bedeutung für die morphologische Forschung.
Dtsch. Med. Wschr. 39, 1752, 1958 (b)

Gössner, W., Studien zur Nekrose und Autolyse in vivo.
Verh. dtsch. Ges. Path. 44, 204, 1960

Gomori, G., Microscopical histochemistry.
Chicago, III: Chicago University Press 1953

Gropp, A., E. Bontke und K. Hupe, Fermenthistochemische Untersuchungen an Fibroblasten und Sarkomgewebe in vitro.
Z. Krebsforsch. 62, 170, 1957

Gropp, A. und K. Hupe, Nachweis von Enzymen an in vitro gezüchteten Makrophagen und epitheloiden Zellen.
Virchows Arch. 331, 641, 1958 (a)

Gropp, A., K. Hupe und H. Hellweg, Zum Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) an in vitro gezüchteten Carcinomzellen.
Naturwiss. 45, 394, 1958 (b)

Gropp, A., und K. Hupe, Fermenthistochemische Untersuchungen an lebenden Zellen in Gewebekulturen.
Klin. Wschr. 1958, 361 (c)

Gusek, W. und J. Lindner, Elektronenmikroskopische Untersuchungen intravitaler Fermentdarstellungen an Ascitestumorzellen.
Frankfurter Z. f. Pathol. 69, 633, 1959

Hawtrey, A.O. and M.H. Silk, Mitochondria of the Ehrlich ascites-tumour cell. Isolation and studies of oxidative phosphorylation.
Biochem. J. 74, 21, 1960

Hinsberg, K., F. Bruns, W. Geinitz, W. Schild und H. Wüst, Aldolase, Dipeptidase, Tripeptidase, Tributyrinase, Phosphatase, Amylase, Proteine und Proteinpolysaccharide in Blutserum und Ascitesflüssigkeit von Mäusen mit Ascitestumor.
Z. Krebsforsch. 60, 72, 1954

Hirono, I., Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase in ascites tumor cells.
Stain Technol. 32, 39, 1957

Höller, H. und F. Leonhartsberger, Die Cholinesterase des Ehrlichschen Mäuseascitestumors.
Krebsarzt (Wien) 9, 233, 1954

Hölscher, H.A., Über den Nachweis von Dehydrasen der Tumorzelle mittels Tetrazoliumsalzen.
Z. Krebsforsch. 56, 587, 1950

Hölscher, H.A., Zur Frage des Fermentgehalts der Granula von Tumorzellen.
Z. Krebsforsch. 57, 353, 1951

Holt, S.J. and R.F.J. Withers, Cytochemical localization of esterases using indoxyl derivatives.
Nature 170, 1012, 1952

Holt, S.J. and R.F.J. Withers, Cytochemical localization of esterases using 5-bromindoxyl acetats.
J. Physiol. 119, 36, 1953

Homann, W., Zur Biologie des Mäuseascitescarcinoms. (1. Mitteilung: Über die Morphologie der Zellteilungsvorgänge beim Mäuseascitescarcinom.)
Z. Krebsforsch. 58, 511, 1952

Homann, W., Funktionsformwechsel an Kernen von Zellen des Mäuseascites-Carcinoms.
Z. Krebsforsch. 59, 673, 1954

Huth, E.F., Über die Entstehung von Riesenzellen beim Mäuseascitescarcinom.
Z. Krebsforsch. 58, 218, 1952

Huth, E.F., Über den unbeeinflussbaren Ablauf des Mäuseascitescarcinoms.
Z. Krebsforsch. 59, 230, 1953

Jakob, A., Untersuchungen über die Struktur der Tumorasciteszelle mit dem elektrostatischen Übermikroskop, zugleich ein Beitrag zur Morphologie der Zelle.
Z. Krebsforsch. 52, 412, 1942

Kaplow, L.S., Histochemical demonstration of leukocyte alkaline phosphatase.
Blood 10, 1023, 1955

Karp, H., Cytodiagnostik maligner Tumoren aus Punktaten und Sekreten.
Z. Krebsforsch. 36, 579, 1932

Kieser, H., Studien zur Granulagenese in den Zellen des Ehrlichschen Ascitestumors der weissen Maus.
Arch. Geschwulstforsch. 10, 119, 1957

Klein, G. and E. Klein, Conversion of solid neoplasms into ascites tumors.
Ann. New York Acad. Sci. 63, 640, 1956

Klug, H., Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ascitestumorzellen.
Z. Krebsforsch. 64, 313, 1961

Kühne, W., Zur Cytologie des Ascitescarcinoms und des Ehrlich-Carcinoms der Maus. Morphologische und statistische Untersuchungen.
Arch. Geschwulstforsch. 12, 338, 1958

Landschütz, Ch., Zytochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase (ATPase) in den Zellen des Ascitestumors der Maus.
Experentia 6, 232, 1950

Landschütz, Ch. und G.A. Kausche, Beobachtungen an Cytoplasmastrukturen des Ascitestumors der Maus mit dem Elektronenmikroskop.
Z. Krebsforsch. 57, 509, 1951

Lettré, H., Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei der Transplantation.
Naturwiss. 37, 335, 1950

Levan, A. and Th.S. Hauschka, Endomitotic reduplication mechanism in ascites tumors of the mouse.
J. Nat. Cancer Inst. (Bethesda), 14, 1, 1953

Lindahl, P.E. and G. Klein, Separation of Ehrlich ascites tumour cells from other cellular elements.
Nature (London) 176, 401, 1955

Lindberg, O., M. Ljunggreen, L. Ernster and L. Revész, Isolation and some enzymic properties of Ehrlich ascites tumor mitochondria.
Exper. Cell Res. 4, 243, 1953

Lindner, J. und H.A. v.Schweinitz, Histochemische und fermenthistochemische Untersuchungen am Geschwulstgewebe.
Verh. dtsch. Ges. Path. 42, 439, 1958

Löblich, H.J. und Ch. Landschütz, Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen am Ehrlich- und Sa I-Ascitestumor.
Z. Krebsforsch. 63, 269, 1960

Loewenthal, H. und G. Jahn, Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen.
Z. Krebsforsch. 37, 439, 1932

Makino, S., Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats.
Ann. New York Acad. Sci. 63, 818, 1956

Malmgren, H., B. Sylvén and L. Revész, Catheptic and dipeptidase activities of ascites tumour cells.
Brit. J. Canc. 9, 473, 1955

McKee, R.W., K. Lonberg-Holm and Jo Ann Jehl, Substrate utilization by Ehrlich mouse ascites carcinoma cells.
Cancer Res. 13, 537, 1953

Niklowitz, W., Zur submikroskopischen Struktur des Zellkernes des Ehrlichschen Asciteskarzinoms der Maus.
Z. Naturforsch. 13 b, 454, 1958

Nirenberg, M.W., An enzymic defect in ascites-tumor cells.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 30, 203, 1958

Patterson, E.K. and E. Podber, Aminopeptidase content as correlated with chromosome constitution in sublines of the Ehrlich ascites tumor.
Ann. New York Acad. Sci. 63, 988, 1956

Pearse, A.G.E., Histochemical, theoretical and applied.
London, J.u.A. Churchill, 2. Auflage 1959

Pirwitz, J., B. Schwär und K.A. Seyfarth, Das Ehrlichsche-Ascites-Carcinom der Maus als Testobjekt zytostatischer Substanzen.
Mikroskopie (Wien) 3. Sonderband, 1949

Schairer, E., Die Kern-Plasma-Relation beim Mäuseascitestumor.
Z. Krebsforsch. 54, 295, 1943

Schairer, E., Untersuchungen über die Zahl und Art der Chromosomen beim Mäuseascitescarcinom.
Z. Krebsforsch. 60, 460, 1955

Schmidt, C.G., H. Schlief, N. Schümmelfeder und G. Menges, Untersuchungen über das Cytochromsystem von Geschwülsten.
Z. Krebsforsch. 60, 682, 1955

Schmitz, H., Über den Nachweis von Dehydrasen am Ascitestumor der Maus mit der Thunberg-Methode.
Z. Krebsforsch. 56, 596, 1950

Schümmelfeder, N., Der adaptive Differenzierungsverlust von Geschwulstzellen bei der Entstehung eines Ascitestumors.
Naturwiss. 41, 232, 1954

Schümmelfeder, N., G. Menges, H. Schlief und C.G. Schmidt, Untersuchungen über glykolytische und dephosphorylierende Fermente in Mäuseascitestumoren.
Z. exper. Med. 125, 507, 1954

Schümmelfeder, N. und W. Wessel, Chromosomenbestand und -morphologie der Zellen des Ehrlich- und des MCa1-Ascitestumor der Maus.
Z. Krebsforsch. 61, 214, 1956

Seeger, P.G., Untersuchungen am Tumorascites der Maus (1. Mitteilung: Vitalfärbbarkeit der Ascitestumorzellen.)
Arch. f. exper. Zellforsch. 20, 280, 1937

Seeger, P.G., Untersuchungen am Tumorascites der Maus (2. Mitteilung: Mikrochemische Untersuchungen.)
Arch. f. exper. Zellforsch. 21, 308, 1938

Seeger, P.G., Unterschiede zwischen normalen Exsudatzellen und Tumorasciteszellen der Maus hinsichtlich ihres vitalfärberischen und mikrochemischen Verhaltens.
Arch. f. exper. Zellforsch. 22, 356, 1939 (a)

Seeger. P.G., Unterschiede zwischen normalen Exsudatzellen und Tumorasciteszellen der Maus hinsichtlich ihres Gehaltes an Follikelhormon.
Z. f. mikroskop.-anatom. Forsch. 46, 153, 1939 (b)

Seeger, P.G., Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms, (Vitamin A).
Arch. f. exper. Zellforsch. 24, 59, 1940 (a)

Seeger, P.G., Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms der Maus, (Vitamin B_1).
Z. f. mikroskop.-anatom. Forsch. 48, 181, 1940 (b)

Seeger, P.G., Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms der Maus, (Vitamin C).
Z. f. mikroskop.-anatom. Forsch. 48, 631, 1940 (c)

Seeger, P.G., Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms der Maus, (Vitamin D).
Z. f. mikroskop.-anatom. Forsch. 48, 639, 1940 (d)

Seeger, P.G., Die Funktion der Cytoplasmagranula und ihre Bedeutung für die cancerogene Entartung.
Z. Krebsforsch. 57, 113, 1950

Seeger, P.G. und W. Schacht, Untersuchungen am Ehrlichschen Asciteskarzinom der Maus, (II. Mitt.: Vergleichende vitalfärberische Untersuchungen an Zellen des Asciteskarzinoms der Maus und normalen Exsudatzellen).
Acta Histochem. (Jena), 6, 139, 1958

Seeger, P.G. und W. Schacht, Untersuchungen am Ehrlichschen Asciteskarzinom der Maus, (V. Mitt.: Vergleichende histochemische Untersuchungen auf Cytochromoxydase an Tumorasciteszellen und normalen Exsudatzellen).
Acta Histochem. (Jena), 7, 217, 1959

Selby, C.C., Electron micrographs of mitotic cells of the Ehrlich mouse ascites tumor in thin sections.
Exper. Cell Res. 5, 386, 1953

Selby, C.C., I.J. Biesele and C.E. Grey, Electron microscope studies of ascites tumor cells.
Ann. New York Acad. Sci. 63, 748, 1956

Talalay, P., E. Kun and H.G. Williams-Ashman, Studies on the Ehrlich ascites tumor. I. The enzymic and metabolic activities of the ascitic cells and the ascitic plasma.
Cancer Res. 11, 855, 1951

Wachstein, M. and E. Meisel, Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic ph.
Amer. J. clin. Path. 27, 13, 1957

Warburg, O. und E. Hiepler, Versuche mit Ascites-Tumorzellen.
Z. Naturforsch. 7b, 193, 1952

Warburg, O., K. Gawehn und G. Lange, Über das Verhalten von Ascites-Krebszellen zu Zymohexase.
Z. Naturforsch. 9b, 109, 1954

Wattenberg, L.W. and J.L. Leong, Effects of Coenzyme Q_{10} and Menadione on Succinic Dehydrogenase Activity as Measured by Tetrazolium Salt Reduction.
J. Histochem. Cytochem. 8, 296, 1960

Weissmann, Ch. und A. Gilgen, Die Fluorochromierung lebender Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen mit Acridinorange und der Einfluss der Glykolyse auf das Verhalten der Zelle.
Z. Zellforsch. 44, 292, 1956

Werth, G., Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Desoxyribonukleinsäuren und der Kernnukleotide der Ascitestumorzellen der Maus. Versuche mit Malachitgrün und einer kombinierten Malachitgrün-, Auramin- und Acridinorange-Färbung.
Acta Histochem. (Jena) 6, 55, 1958

Wessel, W. und W. Bernhard, Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung von Ehrlich- und Yoshida-Ascitestumorzellen.
Z. Krebsforsch. 62, 140, 1957

Williams-Ashman, H.G., Studies on the Ehrlich ascites tumor.
II. Oxidation of hexose phosphates.
Cancer Res. 13, 721, 1953

Wolf, L., Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Schweiz. Z. allg. Pathol. 22, 475, 1959

Yasuzumi, G. and R. Sugihara, A comparative electron microscopic study on Ehrlich-ascites tumor cells, Yoshida sarcoma cells, and human cancerous peritonitis ascites cells.
Cancer Res. 18, 1167, 1958

LEBENSLAUF

Am 30. Mai 1935 wurde ich als Sohn des Bankkaufmannes Werner Northe und seiner Ehefrau, der Lehrerin Gertrud Northe, geb. Kranz, in Halle/Saale geboren.

Meine Grundschuljahre verbrachte ich in Halle, zuerst in der Schule des Wohnbezirks, ab 1946 in der Grundschule der Franckeschen Stiftungen. In gleicher Anstalt kam ich 1949 auf den altsprachlichen Zweig der Oberschule und bestand dort 1953 das Abitur.

Im Herbstsemester 1953/54 begann ich an der Martin-Luther-Universität in Halle mit dem Studium der Mathematik. Aus persönlichen Gründen wollte ich nach zwei Semestern zur Medizin überwechseln. Da ein Studienfachwechsel von der Heimat-Universität nicht genehmigt wurde, ging ich im Herbst 1954 nach West-Berlin, legte dort die geforderte "West-Reifeprüfung" ab und begann an der Freien Universität im Wintersemester 1954/55 mit dem Studium der Medizin. An gleicher Universität schloss ich nach sechs Semestern im August 1957 die Vorklinik mit dem "Physikum" ab. Von den klinischen Semestern studierte ich das erste und die beiden letzten ebenfalls an der Freien Universität, während ich vom zweiten bis zum vierten klinischen Semester an der Universität in Tübingen war, (Sommer 1958 bis Sommer 1959). Nach dem zwölften medizinischen Semester bestand ich im Wintersemester 1960/61 an der Freien Universität Berlin das Staatsexamen.

Mit der Ausbildung als Medizinalassistent begann ich im Juli 1961 an der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Rottweil/Neckar. Vorliegende Dissertation habe ich im Sommer 1958 am Pathologischen Institut der Universität Tübingen angefangen und mit Unterbrechungen bis zum Herbst 1961 unter der Aufsicht von Herrn Dozent Dr. W. Gössner angefertigt.